

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.  
11. Jg. 1973, S. 357—361

## Methodische Schwierigkeiten der Proteinbindungsmethoden zur Bestimmung von Steroidhormonen

Bericht über eine Kleinkonferenz der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie  
am 12. und 13. 11. 1971 auf Schloß Auel bei Köln

Der folgende Bericht gibt eine Zusammenfassung der Diskussionspunkte, die von den Teilnehmern der Kleinkonferenz<sup>1)</sup> gemeinsam erarbeitet wurden. Das Thema wurde in drei Abschnitten diskutiert: (1) Bestimmung von Progesteron sowie von Cortisol und 11-Deoxycortisol mit Plasmaproteinen (Berichterstatter H. K. KLEY), (2) Bestimmung von Testosteron mit Plasmaproteinen (Berichterstatter L. RAITH) und (3) Radioimmunologische Steroidbestimmungen (Berichterstatter P. DOERR und P. W. JUNGBLUT).

### *Methodological difficulties in the determination of steroid hormones by protein binding methods*

The following is a report of the discussions held by the members<sup>1)</sup> of a group meeting organized by the German Society of Clinical Chemistry on 12. and 13. 11. 1971 at Schloss Auel near Cologne. The subject was discussed in three sections. — (1) Determination of progesterone, cortisol and 11-deoxycortisol with plasma proteins (reported by H. K. KLEY). — (2) Determination of testosterone with plasma proteins (reported by L. RAITH). — (3) Radioimmunological determination of steroids (reported by P. DOERR and P. W. JUNGBLUT).

#### **Bestimmung von Progesteron sowie von Cortisol und 11-Deoxycortisol mit Plasmaproteinen**

C<sub>21</sub>-Steroide können mit Hilfe der kompetitiven Proteinbindungsmethode, auch Verdrängungs- oder Sättigungsanalyse genannt, unter Verwendung des Plasmaproteins „Transcortin“ quantitativ nachgewiesen werden. Die Bestimmung der einzelnen Steroide: Cortisol, Corticosteron, Cortison, 11-Deoxycortisol, Progesteron, 17-Hydroxyprogesteron und 11-Deoxycorticosteron verlangt meist relativ aufwendige chromatographische Trennverfahren; dagegen ist die quantitative Bestimmung der Plasmacorticoide als Maß der Cortisolkonzentration einfach und sicher durchzuführen. Grundlage der Bestimmung für Corticoide im Plasma ist das von MURPHY (1) angegebene Verfahren: Extraktion der Corticoide aus geringen Plasmamengen (5–200 µl); evtl. chromatographische Trennung und Reinigung; Inkubation des Trockenrückstandes mit transcortinhaltigem Plasma und einer Tracermenge tritiummarkiertem Cortisol; Trennung der proteingebundenen von der nichtgebundenen Steroidfraktion; Messung der Radioaktivität in einer der beiden Fraktionen; Auswertung anhand einer Eichkurve.

#### **Zur Durchführung der Bestimmungen**

Das Extraktions- und Bestimmungsverfahren erfährt in der Hand fast jedes Ausführenden individuelle Änderungen, ohne daß in der Regel die Genauigkeit beeinträchtigt wird. Transcortinhaltiges Reagenzplasma kann

- a) von Frauen im 3. Trimenon der Schwangerschaft oder nach Einnahme hormoneller Kontrazeptiva,
- b) von endokrin gesunden Männern mit und ohne Östrogenvorbehandlung oder

- c) von Hunden gewonnen werden, deren endogene Corticoid-Bildung durch Dexamethason unterdrückt wird.

Die Verdünnung des Reagenzplasmas erfolgt mit einem geeigneten Puffer — entsprechend dem Transcortin-gehalt und dem gewünschten Meßbereich. Für die Extraktion von Corticoiden eignet sich besonders Dichlormethan (10–20faches Vol.), während andere organische Lösungsmittel für die selektive Extraktion von Steroidgruppen angewendet werden, z. B. niedrigsiedender Petroläther für Progesteron (2) und Tetrachlorkohlenstoff für 11-Deoxycorticoide (3). Bei dünn-schicht-, papier- oder säulenchromatographischer Fraktionierung der C<sub>21</sub>-Steroide sind endogene Standards notwendig. Zur Trennung der transcortingebundenen von der nicht-gebundenen Steroidfraktion wird Florisil oder eine Dextran-Aktivkohle-Suspension verwendet (s. Tab. 1). In dem Bereich, der in der Regel zur Messung der Corticoide bzw. von Cortisol im Plasma verwendet wird (0,2–20 ng), gibt es kein wirkliches Leerwertproblem, während bei Messung der einzelnen Fraktionen im unteren Picogrammbereich überhöhte Leerwerte durch nicht identifizierte Substanzen und Verunreinigungen (z. B. Lösungsmittel, Gefäße, alle chromatographischen Verfahren mit Ausnahme von Sephadexsäulen) hervorgerufen werden.

<sup>1)</sup> R. BERG (Bonn), F. BIDLINGMAIER (München), H. BREUER (Bonn), J. BREUER (Darmstadt), K. DEMISCH (Frankfurt/Main), P. DOERR (München), D. GÜTGEMANN (Bonn), H. R. HENRICH (Freiburg), B. HOPPMANN (Freising-Weihenstephan), P. W. JUNGBLUT (Wilhelmshaven), H. K. KLEY (Düsseldorf), J. KÖBBELING (Göttingen), E. KUSS (München), G. LEYENDECKER (Bonn), L. NOCKE-FINCK (Bonn), L. RAITH (München), CH. SEYFRIED (Darmstadt), H. STEINER (Basel), A. WIRZ (München).

Tab. 1

Vor- und Nachteile von Florisil und dextranbeschichteter Aktivkohle bei Trennung der proteingebundenen von der nichtgebundenen Steroidfraktion bei der quantitativen Corticoidbestimmung mit Hilfe der kompetitiven Proteinbindungsmethode

|  | Florisil   | Dextranbeschichtete Aktivkohle   |
|--|--|--|
| Arbeitstempo   | gut  | sehr schnell bei Verwendung einer Repetierspritze  |
| Einzuhaltende Zeitkonstanz                                       | von etwas geringerer Bedeutung   | Hauptproblem dieser Methode  |
| Inkubationsdauer   | etwas länger   | sehr kurz durch starke Bindung von Cortisol an Aktivkohle  |
| Zentrifugation   | nicht erforderlich   | notwendig (bei 4°C)  |
| Adsorptionsfähigkeit   | wechselnd von Lieferung zu Lieferung; oft unzureichend                                 | relativ konstant   |
| Adsorption des Überschusses an freiem (nicht-gebundenem) Steroid | geringer als Aktivkohle; für Cortisol und Corticosteron etwa gleich                    | sehr hoch; für Cortisol stärker als für Corticosteron  |
| Richtigkeit im Vergleich zu anderen Cortisol-nachweismethoden    | gute Übereinstimmung zur Doppelisotopen-verdünnungs- und zur PORTER-SILBER-Methode (5) | gute Übereinstimmung zum fluorometrischen Cortisolnachweis nach dünnschichtchromatographischer Reinigung (6) |

### Einige allgemeine Hinweise

Kunststoffgefäße und -spritzen (bes. Polyäthylen) geben hohe Leerwerte (durch Weichmacher-Transcortin-Interaktion) und adsorbieren Steroide. Mehrfach verwendete Glasgefäße müssen sorgfältig gereinigt werden (Ultraschall, Erhitzen auf 550°C). Wiederfindungsversuche und Leerwertbestimmungen sollten mit Plasma und nicht mit Wasser durchgeführt werden. Endpunktbestimmung und Extraktion sind gleichmäßig und mit großer Zeitkonstanz durchzuführen. Radioaktive Substanzen müssen regelmäßig chromatographisch auf Reinheit (mindestens 95%) getestet werden. Bei Bestimmung der freien Corticoide im Urin (4) sollte eine möglichst geringe Menge Urin extrahiert werden, da nicht bekannte mitextrahierte Substanzen die Bindung von Cortisol an Aktivkohle bzw. Florisil zu hemmen scheinen.

### Diskussion

Trotz vieler Vorteile der Cortisolbestimmung mit Hilfe der kompetitiven Proteinbindungsmethode gegenüber den konventionellen Nachweisen (z. B. Fluorometrie) wird ihre allgemeine Anwendung durch folgende Beobachtung noch eingeschränkt: Häufig findet sich eine relativ schlechte Übereinstimmung ( $VK > 10\%$ ) der Cortisolkonzentration bei Extraktion aus unterschiedlichen Plasmamengen; dagegen zeigen Doppelbestimmungen aus gleichen Plasmamengen nur eine geringe Variation. Diese Beobachtung wird durch folgende Befunde unterstützt:

Die Wiederfindung für zugesetztes Cortisol ist von der extrahierten Plasmamenge sowie von der Art der Behandlung des Plasmas und des Extraktes abhängig.

Trotz dieser Beobachtungen, die weiterer Untersuchungen bedürfen, kann der Nachweis von Cortisol bzw. Corticoiden im Plasma als klinische Routineuntersuchung befürwortet werden. Bei Reihenuntersuchungen, Funktionstests, Einzelbestimmungen in der Pädiatrie ist diese Methode wegen der geringen Menge an benötigtem Plasma den fluorometrischen Verfahren vorzuziehen. Die quantitative Analyse anderer  $C_{21}$ -Steroide bedarf eines relativ großen Aufwandes der Trennung und Reinigung, sofern sich keine Möglichkeit der selektiven Extraktion wie für Progesteron und 11-Deoxycortisol ergibt.

### Bestimmung von Testosteron im Plasma

Die bisherigen Methoden zur quantitativen Bestimmung von Testosteron im Plasma (Gaschromatographie, Doppel-Isotopen-Methode) sind schwierig und deshalb nur wenigen Speziallaboratorien vorbehalten. — Die Möglichkeit, in vitro radioaktives Testosteron aus seiner „Bindung“ an das sexualhormonbindende Globulin (SHBG) durch nicht markiertes Hormon zu verdrängen, erschien deshalb als ideale Basis zum Aufbau empfindlicher, in der Klinik anwendbarer Testosteronnachweismethoden.

Im Vergleich zur Cortisolbestimmung treten jedoch beim Versuch, Testosteron im Plasma quantitativ mit einer Proteinbindungsmethode zu erfassen, noch eine Reihe zusätzlicher Schwierigkeiten auf, die bisher nicht zufriedenstellend gelöst werden konnten.

Wahl eines geeigneten Plasmas mit ausreichendem Gehalt an sexualhormonbindendem Globulin („Reagenzplasma“)

Der Gehalt des Plasmas an sexualhormonbindendem Globulin (SHBG) von Graviden (mens VI–IX) und von Frauen, die längere Zeit mit einem Ovulationshemmer behandelt wurden, ist meist für Verdrängungsanalysen ausreichend. Plasma bzw. Serum von östrogenbehandelten und kastrierten Männern mit Prostatacarcinom ist übereinstimmend für Testosteronverdrängungsanalysen am besten geeignet. Bei der Gewinnung von Plasma ist für eine ausreichende Gerinnungshemmung zu sorgen. Die optimale Plasmaverdünnung (Phosphatpuffer pH 7,5) ist abhängig vom jeweiligen Gehalt an SHBG und liegt meistens im Bereich von 1:200 bis 1:400.

### Trennung des freien vom proteingebundenen Testosteron

Zur Trennung des freien vom proteingebundenen Testosteron scheinen mit Dextran beschichtete Kohle und Florisil grundsätzlich gleichermaßen geeignet zu sein. Auch die Ammoniumsulfatfällung der proteingebundenen Hormone liefert reproduzierbare Ergebnisse. Es ist jedoch schwierig, alle Bedingungen dieser Trennungsvorgänge (Inkubationszeit, Inkubationsdauer, Menge des Adsorbens, Zentrifugierzeit und Temperatur, Intervall zwischen Zentrifugieren und Abpipettieren des Überstandes) im Routinebetrieb des

Labors für eine größere Serie von Proben exakt einzuhalten. Außerdem ist meist eine monatelange Einarbeitungszeit notwendig. — Besonders wenig stör-anfällig ist aber offenbar eine Methode, bei der das freie Testosteron an einem mit Amberlite (IRA 400) beschichteten Kunststoffplättchen adsorbiert wird. Ein weiterer Vorteil dieses Verfahrens ist, daß bei Raumtemperatur gearbeitet werden kann; dadurch werden zur Einstellung des Austauschendpunktes kürzere Zeiten benötigt als bei Temperaturen nahe am Gefrierpunkt. Die etwas geringere Empfindlichkeit dieses Trennverfahrens, das keine besondere Geschicklichkeit erfordert, wird ausgeglichen durch eine bessere Reproduzierbarkeit von Parallelanalysen.

#### Standardkurven

Es ist nicht schwierig, für den Bereich von 0,5–2,5 ng Testosteron pro Probe zufriedenstellende Eichkurven aufzustellen, wenn das „Reagenzplasma“ *direkt* zu den eingedampften Testosteronproben gegeben wird. Der prozentuale Fehler bei Mehrfachbestimmung der Eichwerte ist dann für alle angewandten Trennverfahren relativ gering und liegt immer unter 5%. Auch wenn jeder einzelne Eichwert durch den gesamten Arbeitsgang der Methode läuft („processed standard“), ergeben sich brauchbare Standardkurven, die mit den „direkt“ bestimmten Werten gut übereinstimmen.

#### Probenaufarbeitung

##### Extraktion

Bereits die Extraktion von Testosteron aus Plasma-proben ist problematisch. Keine Einigkeit besteht darüber, welches organische Lösungsmittel für die Testosteronextraktion bei Proteinbindungsmethoden am besten geeignet ist. Zwar hat sich redestillierter Äther bei anderen Testosteronbestimmungsmethoden bewährt, bei Proteinbindungsanalysen steigt jedoch bei Verwendung von Ätherextrakten der sog. Reagenzien-leerwert (s. u.) erheblich an. Es ist bisher nicht geklärt, ob der peroxidfreie Äther pro narcosi besser zur Extraktion von Testosteron aus Plasma geeignet ist. Dichlormethan ist durch starke Emulsionsbildungen zwar schwieriger zu handhaben, insgesamt scheint es aber nach den bisherigen Erfahrungen bei Proteinbindungsmethoden am besten geeignet zu sein.

#### Chromatographische Trennung von Testosteron von anderen Steroiden

Die Bestimmung von Testosteron in unfractionierten Extrakten ist auch mit der kompetitiven Proteinbindungsmethode nicht möglich, da alle endogenen Steroide und deren Metaboliten mit einer  $17\beta$ -Hydroxylgruppe um die Bindung an das sexualhormon-bindende Globulin — wenn auch in unterschiedlichem Maße — mit Testosteron konkurrieren. Die Spezifität der Proteinbindungsmethode zum Nachweis von Testosteron hängt dadurch ebenso wie bei anderen Methoden von der Vorreinigung der Extrakte ab. Grundsätzlich ist sowohl die Papier- als auch die Dünnschichtchro-

matographie zur Abtrennung von Testosteron geeignet.

#### Verlustbestimmung

Es ist empfehlenswert, zur Bestimmung des Verlustes bei der Extraktion und der Chromatographie bereits dem zu analysierenden Plasma eine relativ kleine Menge  $^3\text{H}$ -Testosteron (2000–4000 Imp./min.) zuzusetzen und im Verdrängungsansatz mit dem Reagenzplasma die notwendige Menge  $^3\text{H}$ -Testosteron „aufzufüllen“.

#### Leerwerte

Nicht gelöst ist das Problem der sog. Papierleerwerte. Bei Elution einzelner Zonen von nicht mit einem Extrakt beschickten Chromatographiestreifen ergeben sich im Verdrängungsansatz zum Teil sehr unterschiedlich hohe Testosteronäquivalente. Es gelingt zwar offenbar, durch intensives Vorwaschen der Papiere mit verdünnter Säure oder Methanol im Soxhlet diese Papierleerwerte unter 0,2 ng pro Probe zu senken; die Ergebnisse schwanken jedoch in dem Bereich zwischen 0 und 0,2 ng, so daß die Bestimmung von Testosteron in Eluaten von Papierchromatogrammen sehr problematisch ist. Nur wenn der Papierleerwert reproduzierbar und additiv konstant ist, wäre es gerechtfertigt, diesen Wert vom eigentlichen Hormonwert abzuziehen. Analoge Schwierigkeiten treten bei Verwendung von Dünnschichtfolien auf, deren Laufeigenschaften durch Vorwaschen mit dem zur Chromatographie verwendeten Lösungsmittelgemisch zwar erheblich gebessert werden können, bei denen es jedoch ebenfalls nicht gelingt, den Folienleerwert konstant auf „Null“ zu senken. Zu berücksichtigen sind ferner Fehlermöglichkeiten durch unterschiedlichen Reinheitsgrad der Lösungsmittel und z. B. auch des zum Einengen der Eluate verwendeten Stickstoffs. Insgesamt lassen hohe Leerwerte erhebliche Zweifel an der Spezifität der Testosteronbestimmung im Plasma von Frauen aufkommen, denn bei Umrechnung der Leerwerte auf 100 ml Ausgangsmaterial ( $\text{H}_2\text{O}$ ) liegen die Werte häufig in der Größenordnung gesunder, nicht schwangerer Frauen.

#### Zuverlässigkeitskriterien

##### Genauigkeit

Bei Unterschieden des Leerwertes von  $-0,2$  bis  $+0,2$  ng pro Ansatz würde sich bei einer Testosteronkonzentration von z. B. 2 ng pro Probe nur eine maximale Differenz der Endergebnisse von 20% ergeben. Die tatsächlichen Schwankungen der Ergebnisse bei Mehrfachuntersuchungen sind jedoch weitaus höher; außerdem zeigen die Resultate häufig keine Normalverteilung und in Untersuchungsserien werden in einem relativ hohen Prozentsatz extreme Abweichungen einzelner Werte vom Mittelwert beobachtet. Die Bestimmung von Doppelwerten bietet deshalb keine ausreichende Gewähr gegen Fehlbestimmungen.

##### Empfindlichkeit

Grundsätzlich wäre die Empfindlichkeit der Proteinbindungsmethoden ausreichend, um auch bei nicht

schwangeren Frauen in relativ kleinen Plasmaproben die Testosteronkonzentration zu bestimmen.

#### *Richtigkeit*

Bei gaschromatographischer Bestimmung von Testosteron im Plasma als Referenzmethode stimmen zumindest bei Männern die Ergebnisse mit den Werten der kompetitiven Verdrängungsanalyse relativ gut überein.

#### *Spezifität*

Durch Chromatographie in mehreren Systemen kann ein relativ hoher Grad an Spezifität erreicht werden. Bei niedrigen Plasmakonzentrationen ist die Spezifität jedoch durch die hohen Leerwerte erheblich eingeschränkt.

### **Radioimmunologische Steroidbestimmungen**

#### **Gewinnung von Antiseren**

##### *Wahl eines geeigneten Antigens*

Bei der Synthese von steroidhaltigen Antigenen ist darauf zu achten, daß die für das betreffende Steroid typischen funktionellen Gruppen erhalten bleiben. Das synthetisierte Steroidderivat sollte isoliert und identifiziert werden, bevor es an das Trägerprotein gekuppelt wird. Allgemein verbindliche Regeln für ein optimales Kupplungsverhältnis können aufgrund der bisherigen Erfahrungen noch nicht gegeben werden. So wurde z. B. mit Progesteron-21'-Derivaten bei Kaninchen keine Synthese von Antikörpern provoziert, wenn das Kupplungsverhältnis unter 10:1 (Progesteron/Trägerprotein) lag. Östrogen-2'- und 4'-Derivate führen dagegen noch im Kupplungsverhältnis 1:1 zur Antikörperbildung bei Kaninchen, was wahrscheinlich auf die aromatische Natur des A-Rings zurückzuführen ist. Hinweise auf eine Abnahme der Steroidbindungaffinität der erzeugten Antikörper mit steigendem Kupplungsverhältnis des Antigens (Steroid/Träger) bedürfen der Bestätigung. Schwer lösliche (scheinbar unlösliche) Steroid-Proteinkonjugate können gute Antigene sein, weil sie eine langsame Resorption von der Injektionsstelle gewährleisten.

##### *Immunisierungsmodus*

Antigendosis, Applikationsort und -häufigkeit sind neben der „Antigenität“ der verabreichten Substanz wichtige Faktoren der Immunantwort. Die initial verabreichte Menge von Antigen darf nicht zu groß sein, und möglichst viele Regionen sollen zur Antikörperbildung angeregt werden (multilokuläre Injektionen haben sich bewährt).

Bei Kaninchen hat sich eine Dosis von 2 mg Antigen (MW 70000), gelöst in 0,4 ml Puffer und emulgiert mit 0,4 ml FREUND's komplettem Adjuvans, bewährt. Je 0,2 ml dieser Emulsion werden in die Interdigitalfalten aller vier Extremitäten injiziert. Das Adjuvans bewirkt eine verzögerte Antigenresorption und verursacht eine unspezifische Entzündung, die zur Proliferation der regionalen Lymphknoten führt. Boosterinjektionen (mit der gleichen Dosis) werden zweckmäßigerweise

s. c. in die Axillen und Leisten gegeben. Der erste Booster kann 3–4 Wochen nach der ersten Injektion erfolgen. Weitere Boosterinjektionen vermögen den Antikörpertiter zu steigern, jedoch geschieht das unter der Gefahr eines Spezifitätsverlustes. (Funktionelle Gruppen des kovalent an den Proteinträger gebundenen Steroids können im Tier enzymatisch verändert werden.) Die Chance, spezifische Antikörper zu erhalten ist am größten, wenn das Serum etwa 8–10 Tage nach der ersten Boosterinjektion gewonnen wird. Die Antiseren können entweder gefroren (in kleinen Portionen) oder lyophilisiert aufbewahrt werden. Bei Schafen und Meerschweinchen kann mit den gleichen Dosen (Applikation s. c. in die Unterschenkel) und Zeitabständen gearbeitet werden.

#### **Tierspezies und Geschlecht**

Kaninchen, Schafe und Meerschweinchen werden am meisten benutzt. Daß weibliche Tiere bessere Antikörperbildner sind als männliche ist eine „allgemeine Erfahrung“, jedoch nicht mit Sicherheit belegt. Höhe und Art der Immunantwort können beträchtliche individuelle Variationen zeigen. Der Vorstellung, hohe endogene Hormonkonzentrationen könnten die Immunantwort gegen ein Steroid-Protein-Konjugat verhindern oder verringern, widerspricht die Beobachtung der Synthese östradiolbindender Antikörper bei schwangeren Meerschweinchen und Kaninchen.

#### **Charakterisierung der Antiseren**

Antiseren, die nach Immunisierung mit Steroid-Protein-Konjugaten erhalten werden, enthalten praktisch immer verschiedene Populationen von Antikörpern. Neben einer teilweisen Veränderung funktioneller Gruppen des Steroids im immunisierten Tier ist als Ursache dafür anzuführen, daß „gemischte“ antigene Determinanten des Kupplungsprodukts, bestehend aus dem Steroid bzw. einem Teil der Steroidstruktur und benachbarten (jeweils verschiedenen) Oberflächenarealen des Proteinträgers, die Synthese entsprechend komplementärer Antikörper provozieren. Man wird deshalb bei der Charakterisierung von steroidbindenden Antiseren immer Mittelwerte erhalten, was jedoch für die Praxis ohne Bedeutung ist. Wichtige Merkmale der Antiseren sind Spezifität, Affinität und Kapazität für die Steroidbindung. Meistens begnügt man sich mit einer summarischen Bestimmung der Eigenschaften, die davon ausgeht, daß

- a) die Assoziationskonstanten der Antikörper für Steroide bei niedrigen Temperaturen (0–4°C) wesentlich größer sind als bei Raum- oder Körpertemperatur;
- b) das Bindungsoptimum zwischen pH 7,5 und 8,5 liegt und
- c) die Antikörper bei Ionenstärken von  $\mu = 0,05$ –0,1 stabil sind.

Prinzip aller Messungen ist die Ermittlung der Menge des vom Antiserum als Hapten gebundenen Steroids. Zur Abtrennung des ungebundenen Steroids bei

Assoziationskonstanten von  $10^9$  l/mol ist „dextran-beschichtete“ Aktivkohle gut geeignet (z. B. 0,5% Norit A, 0,05% Dextran T 70). Falls bei sehr hohen Titern eine Verdünnung des Antiserums unter 0,25 mg Gesamtprotein/ml notwendig wird, um im empfindlichen Bereich (10–250 pg Steroid) zu bleiben, besteht die Gefahr einer Störung durch Adsorption von (beladenen) Antikörpern an die Kohle. Diese Gefahr läßt sich durch Zusatz von inerten Proteinen ausschalten.

Faustregeln für das Erstellen einer brauchbaren Standardkurve sind:

- a) Über den gesamten Konzentrationsbereich sollen mindestens 50% des zugesetzten Steroids (radioaktiv und nichtradioaktiv) von den Antikörpern gebunden werden;
- b) Die zugesetzte Menge an radioaktivem Steroid muß so gewählt werden, daß der statistische Zählfehler keine Rolle spielt.

Störfaktoren sind insbesondere „unmerkliche“ Temperaturerhöhungen, die z. B. beim mechanischen Schütteln nach Zugabe der Kohlesuspension in Kälteräumen (0–4°C) auftreten, wenn auf Badkühlung verzichtet wird. Die zunehmende Erwärmung der Schüttelmaschinen macht sich vor allem bei Serienbestimmungen bemerkbar, deren Anfangswerte dann beträchtlich höher liegen als die Endwerte.

#### Probenaufarbeitung

##### *Extraktion und Chromatographie*

Da eine Direktbestimmung von Steroidhormonen in Serumproben noch nicht möglich ist, kann auch die radioimmunologische Bestimmung nur nach vorheriger Extraktion und chromatographischer Trennung der Steroide durchgeführt werden. Die bei den Proteinbindungsmethoden genannten Vorsichtsmaßregeln sind um so mehr zu beachten, als die radioimmunologischen Verfahren meistens mit geringeren Substanzmengen arbeiten.

##### *Reagenzienleerwert*

Die Herstellung eines brauchbaren Reagenzienleerwerts umfaßt den gesamten Arbeitsgang.

#### Verschiedene technische Einzelheiten

##### *Radiochemische Reinheitsprüfung*

Die radiochemische Reinheit des markierten Steroids soll nicht unter 95% liegen. Sie ist nach Zusatz von nichtmarkiertem Steroid mit Papier- oder Dünnschichtchromatographie zu kontrollieren. Papierchromatographie wird bevorzugt, weil das Papier leicht mit einem einfachen Schneidegerät unterteilt und die Abschnitte

nach Zugabe eines geeigneten Szintillationsgemischs direkt gezählt werden können. Beim Unterteilen von Dünnschichtchromatogrammen besteht die Gefahr des „Zerstäubens“, scanning erfordert sehr hohe  $^3\text{H}$ -Aktivitäten.

##### *Aufbewahrung von radioaktiv markierten Verbindungen*

Da es sich grundsätzlich um  $^3\text{H}$ -Verbindungen hoher spezifischer Radioaktivität handelt, ist die Gefahr einer radiochemischen Zersetzung beträchtlich. Stammlösungen von 1  $\mu\text{Ci}$  Steroid/ml sind routinemäßig etwa alle 4 Wochen zu reinigen (Papierchromatographie ohne Zusatz von nichtmarkiertem Steroid). Am besten ist es, die Steroide in organischen Lösungsmitteln in so geringen Konzentrationen aufzubewahren, daß nicht mehr als ein bis zwei Verdünnungsschritte notwendig sind, um die wäßrige Gebrauchslösung zu erhalten. Empfohlen wird die Aufbewahrung in Benzol bei 6°C (Kristallisation des Benzols vermeiden!) und in Methanol bei –15°C bis –30°C (Haushaltstiefkühltruhe).

##### *Substanzverluste durch Sublimation; Stabilität wäßriger Gebrauchslösungen*

Beim Einengen von Steroidlösungen in organischen Lösungsmitteln können erhebliche Substanzverluste durch Sublimation eintreten. Wäßrige Gebrauchslösungen von 1 nmol/l sind frisch herzustellen.

##### *Volumenmeßgeräte und Gefäße*

„Einmal“-geräte und -gefäße werden bevorzugt. Es ist jedoch zu beachten, daß Steroide von Polystyrol, PVC, Polyäthyl und Polypropylen adsorptiv gebunden werden. Die Adsorption an Glas ist vergleichsweise gering.

Bei Volumenmeßgeräten muß völliger Auslauf gesichert sein. Gut benetzende Konstriktionspipetten sind zwar umständlicher zu handhaben, bieten jedoch mehr Sicherheit als Marburg-Pipetten. „Gasdichte“ Mikroliterspritzen mit Teflonstempel sind bei Raumtemperatur sehr präzise, lecken jedoch im Kältelabor.

##### *Reinigung von Glasgeräten*

Wenn Detergentien benutzt werden, muß mit verdünnter Säure nachgewaschen werden. Bei Verwendung von Chromschwefelsäure ist Nachwaschen mit 0,1proz. Sulfitlösung erforderlich. Glasgeräte sollen vor der Benutzung drei Stunden auf etwa 500–600°C erhitzt werden. Diese Behandlung wird von „Blaubrand“ oder gleichwertigen Pipetten toleriert. Über Konstriktionspipetten liegen in dieser Hinsicht keine Erfahrungen vor.

H. BREUER

Institut für Klinische Biochemie  
D-53 Bonn-Venusberg

#### Literatur

1. MURPHY, B. E. P. (1967), J. Clin. Endocr. 27, 973–989. —
2. JOHANSSON, E. D. B. (1969), Acta Endocr. 61, 592–606. —
3. MURPHY, B. E. P., HOOD, A. B. & PATTEE, C. J. (1964), Canad. Med. Ass. J. 90, 775–780. —
4. Hsu, T. H. & BLEDSOE, T. (1970),

- J. Clin. Endocr. 30, 443–448. —
5. BEITINS, I. Z., SHAW, M. H., KOWARSKI, A. & MIGEON, C. J. (1970), Steroids 15, 765–776. —
6. NUGENT, C. A. & MAYES, D. M., (1966) J. Clin. Endocr. 26, 1116–1122.